

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 23.10.2015. godine, broj 5940/1, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Prognosti ki zna aj angiogeneze i ekspresije adhezivnih molekula stromalnih elija kod bolesnika sa folikularnim i difuznim B krupno elijskim limfomom”

kandidata dr Jelene Jeli i , zaposlene na Klinici za Hematologiju Klini kog Centra Srbije. Mentor je Prof. dr Milena Todorovi Balint.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Biljana Mihaljevi , redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.
2. Prof. dr Predrag ur evi , vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu.
3. dr Sonja Pavlovi , nau ni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i geneti ko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu.

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija dr Jelene Jeli i napisana je na 145 strana i podeljena je na slede a poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaklju ci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 30 tabela, 9 slika i 46 grafikona. Doktorska

disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korištenih u tekstu.

U uvodu se razmatra aktuelnost teme, sa osvrtom na aktuelne prognoze i parametre koji bi predviđali preživljavanje i optimizovale terapijsku strategiju kod pacijenata sa difuznim B-krupno-elijskim limfomom (DBKL), primarnim DBKL centralnog nervnog sistema (DBKL CNS-a) i folikularnim limfomom (FL). Dane su definicije bolesti, kao i pojedinih entiteta u okviru DBKL u skladu sa najnovijom klasifikacijom Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO), uz kratak istorijski osvrt na klasifikaciju limfoproliferativnih bolesti od 70-tih godina do danas.

Dat je opis morfoloških, bioloških i kliničkih karakteristike DBKL i FL. Objasnjeno je princip dijagnostike DBKL i FL, na osnovu imunohistohemijskih i molekularnih karakteristika ovih tumora i detaljno su prikazani molekularni biomarkeri značajni za dijagnozu i razlikovanje u odnosu na druge entitete. Pojedini imunohistohemijski markeri su izdvojeni i posebno analizirani sa ciljem izdvajanja visokoriziknih bolesnika i optimizaciji njihovog lečenja. Objasnjeno su rezultati GEP analize (engl. *gene expression profiling*) na osnovu koje su podeljeni bolesnici u dve podgrupe (GCB i non GCB), kao i značaj neoangiogeneze i ekspresije adhezivnih molekula koji su povezani sa stvaranjem novih krvnih sudova u tumorskom tkivu. Posebno je data analiza dejstva novih lekova u DBKL i FL, kao i analiza podentiteta DBKL u centralnom nervnom sistemu. Objasnjeno je različito ponašanje primarnog DBKL CNS-a u odnosu na nodalne i ekstranodalne DBKL, na osnovu imunohistohemijske analize kao i genetskih analiza sa ciljem pronalaska razlika i razlika u mutiranim genima.

Detaljno je dat opis osnovnih kliničkih, imunohistohemijskih i genetskih parametara koji se koriste i/ili koji mogu biti od koristi za predviđanje ishoda bolesti uz standardne preporuke za lečenje za DBKL, primarnog DBKL CNS-a i FL.

Ciljevi istraživanja su precizno definisani i primereno obrazlažu istraživanje. Ciljevi obuhvataju analizu epidemioloških, kliničkih, patohistoloških i laboratorijskih parametara kod bolesnika sa DBKL i FL. Takođe, ispituju uticaj gustine krvnih sudova i prisustva adhezivnih molekula stromalnih i tumorskih ćelija na tok i ishod bolesti. Osim toga cilj je bio testiranje

značaj aktuelnih prognostičkih indeksa, korelacija sa karakteristikama mikrosredine tumora i tumorskih elija kao i analiza posebnog entiteta primarnog DBKL CNS-a putem genskog sekvencioniranja radi definisanja ekspresije mutiranih tumorskih gena.

U poglavlju Materijal i Metode navedeno je da je za istraživanje korišćen biopsijski materijal 202 bolesnika kojima je bio dostupan dijagnostički tumorski material fiksiran na formalinu i ukalupljen na parafinu. Analizirano je 22 bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a, zatim 49 bolesnika sa nodalnim DBKL, 66 sa ekstranodalnim DBKL (izuzev primarnog DBKL CNS-a) i 65 bolesnika sa FL koji su dijagnostikovani i lečeni na Klinici za Hematologiju Kliničkog Centra Srbije u Beogradu, u periodu od 2003-2013. godine. U daljem postupku dat je opis dijagnostike bolesnika sa limfomom, na in-patohistološke i imunohistohemijske analize uzoraka dijagnostičkog tumorskog tkiva prema kriterijumima klasifikacionog sistema SZO. Opisana je imunohistohemijska analiza, sprovedena korišćenjem sledećih monoklonskih antitela: CD20, CD79, CD3, CD5, CD10, BCL2, BCL6, MUM-1, CD138, CD30, HLA-DR, i Ki 67. Tako je opisana je metoda tkivnog mikroniza (tissue microarray – TMA), koja je sprovedena kod većine bolesnika. Osim imunohistohemijske analize, detaljno je dat opis NGS metode kod 19 bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a koja su analizirana korišćenjem TruSeqAmplicon – Cancer Panel, TSACP, koji predstavlja panel tumorskih gena koji prepoznaje mutacione promene u 48 gena povezanih sa karcinomima. U nastavku dat je opis statističkih metoda koji su korišćeni u radu.

Metodološki pristup objašnjen je posebnim odeljcima: terapijski principi, imunohistohemijska analiza, konstrukcija tkivnog mikroniza, gensko sekvencioniranje, statistička obrada.

U poglavlju **Rezultati** su izneti originalni podaci koji su dobijeni u ovom istraživanju, pregledno i sistematično predstavljene, i sistematizovane u skladu sa postavljenim ciljevima. U okviru posebnih odeljaka analizirane su epidemiološke i kliničke karakteristike, laboratorijski testovi, imunohistohemijski markeri, elijsko poreklo DBKL prema Visco-Youngovom i Hansovom algoritmu, korelacije kliničkih i imunohistohemijskih parametara, odgovor na terapiju, prognostički parametri kod DBKL, primarnog DBKL CNS-a i FL, kao i analiza

preživljavanja i mutacioni profil bolesnika sa primarnim DBKL CNS dobijen upotrebom analize genskog sekvencioniranja

Diskusija dobijenih rezultata napisana je jasno i pregledno, uz integrativni pristup problematici definisanja nezavisnih kliničkih, patohistoloških, imunohistohemijskih i genetskih prognostičkih parametara sa ciljem izdvajanja visokorizikne grupe bolesnika sa DBKL, primarnim DBKL CNS-a i FL a na osnovu kojih bi se pre otpočinjanja terapije procenila potreba za intenzifikacijom lečenja.

Zaključci su taksativno navedeni i prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Korišćena **literatura**, sadrži spisak od 213 referenci.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Istraživanje je pokazalo da je starosna dob analizirane populacije bolesnika sa DBKL, primarnim DBKL CNS-a i FL niža u poređenju literaturnim podacima. Kod bolesnika sa DBKL na postizanje povoljnog terapijskog odgovora pored pojedinih kliničkih parametara utiču i absolutni broj limfocita (ALC) i limfocitno-monocitni odnos (ALC/AMC), dok Internacionalni Prognostički Indeks (IPI), revidirani-IPI (R-IPI) i NCCN-IPI zadržavaju prognostičku značajku. U odnosu na elijsko poreklo kod DBKL bolesnika, i Hansov i Visco-Young algoritam su pokazali bolje preživljavnje grupe sa GCB DBKL uz postojanje visokog procenta slaganja između ova dva algoritma. Kao pojedinačni imunohistohemijski markeri sa povoljnim ukupnim preživljavanjem kod bolesnika sa DBKL su se izdvojili pozitivna ekspresija CD10, BCL6 i snižena ekspresija BCL2 i FOXP1 (<80%), dok je visoka gustina krvnih sudova u tumorskom tkivu korelirala sa lošim ishodom. Ekspresija adhezivnog molekula CD44s na stromalnim ćelijama u tumorskom tkivu DBKL-a je bila niska (do 10%) uz varijabilnu ekspresiju na tumorskim ćelijama, koja nije imala prognostičku značajku.

Kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a na preživljavanje su uticali AMC, IELSG skora i hirurški terapijski pristup (kompletna resekcija tumorske mase vs. parcijalna resekcija ili samo biopsija). Gustina tumorske vaskularizacije kao i visoke ekspresije CD44s na

tumorskim elijama nisu uticali na preživljavanje. NGS analiza je pokazala prisustvo visokorizi nih mutacija u preko 80% u genima CTNNB1, PIK3CA, PTEN, ATM, KRAS, PTPN11, TP53 i JAK3, dok je TP53 bio mutiran kod svih 19 bolesnika sa primarnim DBKL CNS. Visokorizi ne mutacije u genima ATM, PTEN, SMO i ERBB4 su potencijalno povezane sa lošijim OS-om, dok je prisustvo mutacija u genima ATM, APC SMO i ERBB4 povezano sa kraćim EFS-om, a mutacije u genu SMO utiču na raniju pojavu recidiva bolesti.

Kod bolesnika sa FL na preživljavanje su uticali pol, FLIPI, ALC, ALC/AMC, gradus FL, a od pojedina nih imunohistohemijskih markera ekspresija CD10 30%, MUM1 80%, FOXP1 60%. Gustina tumorske vaskularizacije nije bila od prognosti kog značaja. Ekspresija adhezivnog molekula na stromalnim elijama u tumorskom tkivu FL je bila veoma visoka (90%), uz varijabilnu ekspresiju CD44s na tumorskim elijama (0-100%) koja je bila u korelaciji sa preživljavanjem bolesnika sa FL.

C) Uporedna analiza rezultata doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U doktorskoj disertaciji pregledno i temeljno su upoređivani rezultati ovog istraživanja sa relevantnim nalazima drugih autora koji se bave kliničko-patološkim analizama DBKL i FL, kao i genetskom analizom primarnog DBKL CNS-a. Pregled literature daje vrlo heterogene podatke o prognosti kojim značajaju pojedinih kliničko-patoloških i imunohistohemijskih parametara.

IPI je prognostički model koji se koristi u predviđanju terapijskog odgovora i ishoda bolesti kod pacijenata sa DBKL (Sehn i sar. 2007; Barton i sar.2012.). Sa uvođenjem rituksimaba, IPI je doživio više revizija u cilju boljeg prepoznavanja visokorizi nih bolesnika uključujući i R-IPI koji je pokazao prognostičku značajnost u eri rituksimaba (Sehn i sar. 2007). Imaju i u vidu da oko 20-30% bolesnika sa DBKL ne reaguje na terapiju, razvijen je NCCN-IPI koji bolje stratifikuje bolesnike na četiri rizikne grupe (Yamada i sar. 2015.). Kod primarnog DBKL CNS-a, IELSG skor se pokazao prediktivan u više studija (Ghesquières i

sar. 2013; Rubenstein i sar. 2013). Kod FL Solal-Celigny i sar. su dizajnirali prognosti ki indeks za folikularne limfome – FLIPI, u eri pre primene rituksimaba, ali je zna aj ovog indeksa potvr en u drugim studijama u eri rituksimaba (Buske i sar. 2006.).

Na osnovu GEP analize dva podtipa DBKL su identifikovana uklju uju i GCB i non-GCB podtip koji se razlikuju u pogledu preživljavanja i prisustva genskih aberacija odgovnih za tumorsku patogenezu (Alizadeh i sar. 2000; Rosenwald i sar. 2002.). Na osnovu GEP-a razlikuju se bolesnici sa stromalnim potpisom 1, koji reflektuje depoziciju van elijskog matriksa i infiltraciju elijama monocitne linije, kao bolesnici sa stromalnim potpisom 2, koji reflektuje visoku gustinu krvnih sudova tumora. U FL, GEP analiza je potvrdila uticaj ne-neoplasti nih tumor infiltrišu ih T- elija i makrofaga na osnovu dva genska potpisa: IR-1 koji je visoko eksprimiran u T- elijama i IR2 koji je predominantno eksprimiran u monocitima. Na bazi GEP analize, u cilju klini kog reprodukovanja navedenog nalaza ispitivan je uticaj ALC, AMC i ALC/AMC kao lako dostupnih klini kih parametara i biomarkera tumorske mikrosredine (Dave isar. 2004; Bari i sar. 2009; Cox i sar. 2008; Kim i sar. 2007; Oki i sar. 2008). Više studija je potvrdilo zna aj niskog ALC-a na dijagnozi kod bolesnika sa DBKL kao negativnog prognosti kog faktora (Oki i sar. 2008.). Li i sar. su utvrdili da je $ALC/AMC < 2.6$ nezavisni negativni prognosti ki parametar kod bolesnika sa DBKL le enih imunoheioterapijom, dok su Belotti i sar. dokazali lošiji 2-godišnji PFS (engl. *progression free survival*), ali ne i uticaj na postizanje kompletne remisije – CR (Li i sar. 2012, Belotti i sar. 2015.). Behl i sar. i Siddaqui su pokazali da kod obolelih od FL duže trajanje remisije i postizanje viših stopa CR kod bolesnika sa višiom vrednoš u ALC u odnosu na bolesnike sa nižim ALC (Behl i sar. 2007, Siddiqui i sar. 2006.). Belotti i sar. su pokazali da je $ALC/AMC > 2$ udružen da dužim periodom do po etka le enja kod bolesnika sa FL u odnosu na $ALC/AMC < 2$ kod bolesnika koji su bili na „*watch and wait*“ pristupu, dok je kod bolesnika le enih imunoheioterapijom udružen sa superiornijim 2-godišnjim PFS-om (Belotti i sar. 2015). Kumagai i sar. su utvrdili da je $ALC/AMC < 4.7$ udružen sa lošijim PFS, (Kumagai i sar. 2014.). Od trenutka kada su rezultati GEP-a ukazali na postojanje dva razli ita podtipa DBKL više studija je na injeno u cilju reprodukovanja ovih nalaza u lako dostupne imunohistohemijske algoritme s obzirom da je GEP analiza još uvek nedostupna u ve ini laboratorija i nije standardna metoda za odre ivanje podgrupa DBKL (Hans i sar.

2004; Choi i sar. 2009; Carlo Visco i sar. 2013; Nyman i sar. 2009). Više imunohistohemijskih algoritama je predloženo u cilju razlikovanja imunohistohemijskih podgrupa na bazi GEP analize, ali sa nekonzistentnim podacima u eri rituksimaba ((Hans i sar. 2004; Choi i sar. 2009; Carlo Visco i sar. 2013; Nyman i sar. 2009.).

Analiza pojedinih imunohistohemijskih markera (CD10, BCL6, BCL2, MUM1, FOXP1) kod bolesnika sa limfomom je ukazala na povezanost sa prognozom, ali sa esto opre nim rezultatima (Culpin i sar. 2013; Sjö i sar. 2007; Lossos i sar. 2001, Winter i sar. 2006; Iqbal i sar. 2006; Seki i sar. 2009; Xerri i sar. 2014; Brown i sar. 2008; Barrans i sar. 2004; Banham i sar. 2005). Neoangiogeneza je od zna aja za tumorski rast, invazivnost i progresiju, ali je njen prognosti ki zna aj kod bolesnika sa DBKL, primarnim DBKL CNS-a i FL teško utvrditi zbog heterohenosti analiziranih studijskih populacija (Ruan i sar. 2009; Folkman 1995; Cardesa-Salzmann i sar. 2011; Gratzinger i sar. 2010.). Tako e, u literaturi postoje opre ni podaci u pogledu povezanost ekspresije adhezivnog molekula CD44s na tumorskim i stromalnim elijama kod DBKL i FL (Nagel i sar. 2010; Tzankov i sar. 2003; Wei i sar. 2014; Higashi i sar. 2009.)

Uprkos na injenim poboljšanjima u le enju bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a, postoji potreba za razjašenjenjem etiologije limfoma u mozgu i uzroka neuobi ajenog tropizma limfomskih elija za pojedine moždane strukture (Rubenstein i sar. 2013.). Napredak na polju NGS tehnologije omogu ava široku analizu somatskih mutacija brojnih solidnih tumora i hematoloških maligniteta (Luthra i sar. 2014.). Više studija je identifikovalo rekurentne somatske mutacije u genima koji imaju klju nu ulogu u biološkim procesima, a koje mogu biti zajedni ke ili razli ite kod nodalnog DBKL i primarnog DBKL CNS-a (Bruno i sar. 2014; Vater i sar. 2015; Lawrence i sar. 2013; Braggio i sar. 2015.). Me utim, ve ina sprovedenih studija je koristila metode sekvencioniranja kompletnog genoma (*whole genome and whole exome sequencing*) koje predstavljaju sveobuhvatne analiti ke procese za detekciju kancerskih mutacija koje su ograni ene dubinom itanja što dalje limitira njihovu sposobnost za detektovanje somatskih mutacija. S druge strane ciljano sekvencioniranje pojedinih gena (NGS) predstavlja alternativni pristup prethodnim metodama, koji omogu ava ve u dubinu itanja i ve u preciznost u detekciji nisko frekventnih somatskih varijanti (Xu i sar. 2014.).

D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske teze

1. Jelena Jelacic, Milena Todorovic Balint, Darko Antic, Aleksandra Sretenovic, Bela Balint, Maja Perunicic Jovanovic, Bosko Andjelic, Vojin Vukovic, Vladislava Djurasinovic, Jelena Bila, Mirjana Pavlovic, Mihailo Smiljanic, Biljana Mihaljevic.

Enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI), Charlson Comorbidity Index and absolute lymphocyte count as predictors for survival of elderly patients with diffuse large B cell lymphoma treated by immunochemotherapy. *Neoplasma*. 2015 Oct 13. doi: 10.4149/neo_2015_120. [Epub ahead of print]

2. Jelena Jelacic, Milena Todorovic Balint, Sava Raicevic, Rosanda Ilic, Dejana Stanisavljevic, Jelena Bila, Darko Antic, Bela Balint, Bosko Andjelic, Vladislava Djurasinovic, Aleksandra Sretenovic, Vojin Vukovic, Biljana Mihaljevic.

The possible benefit from total tumour resection in primary diffuse large B-cell lymphoma of central nervous system - a one-decade single-centre experience. *Br J Neurosurg*. 2015 Sep 4:1-6. [Epub ahead of print]

E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „**Prognostički značaj angiogeneze i ekspresije adhezivnih molekula stromalnih ćelija kod bolesnika sa folikularnim i difuznim B krupno ćelijskim limfomom**” kandidata dr Jelene Jelčić, predstavlja originalni naučni doprinos istraživanjima u oblasti hematopatologije, posebno DBKL, primarnog DBKL CNS-a i FL. Sveobuhvatna analiza kliničkih, patoloških parametara sa osvrtnom na neoangiogenezu i ulogu adhezivnih molekula stromalnih i tumorskih ćelija značajnih za prognozu i terapiju DBKL, kao i analiza bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a metodom NGS-a, predstavlja jedinstvenu analizu

sprovedenu u našoj zemlji. Ova doktorska disertacija urađena je prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan, a metodologija rada je bila kompleksna i savremena, uz integrisan kliničko-patološko-genetički pristup problemu. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu navedenog, Komisija smatra da doktorska disertacija „**Prognostički značaj angiogeneze i ekspresije adhezivnih molekula stromalnih ćelija kod bolesnika sa folikularnim i difuznim B krupno ćelijskim limfomom**” kandidata dr Jelene Jelić, predstavlja originalni naučni doprinos i predlaže Naučnom vešću da prihvati priloženu disertaciju i odobri njenu javnu odbranu.

U Beogradu, 02.11.2015.

Članovi Komisije:

Prof. dr Biljana Mihaljević,
predsednik komisije

Prof. dr Predrag Đurđević

dr Sonja Pavlović, naučni savetnik

Mentor:

Prof. dr Milena Todorović Balint
